

Japanese Patent Laid-open Publication No. SHO 49-69888 A

Publication date : July 5, 1974

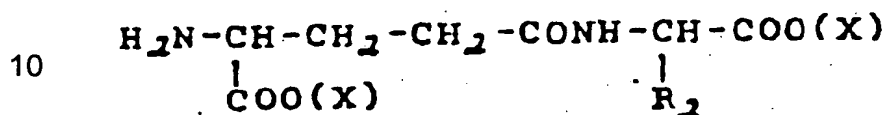
Applicant : KYOWA HAKKO KOGYO

Title : Method for producing γ -glutamyl peptide

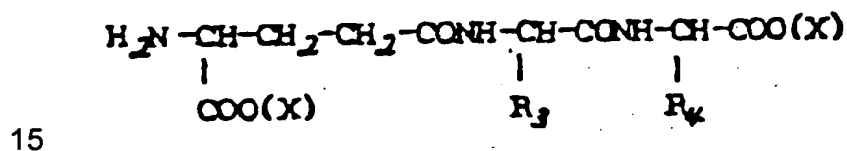
5

2. What is Claimed is:

A method for producing γ -glutamyl dipeptide, γ -glutamyl tripeptide or salt thereof being represented in formula (IV);

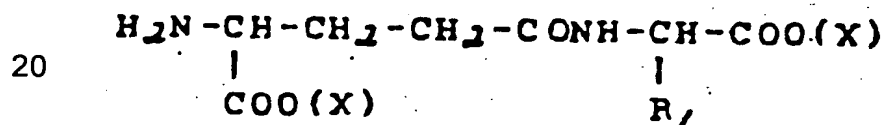


or formula (V);

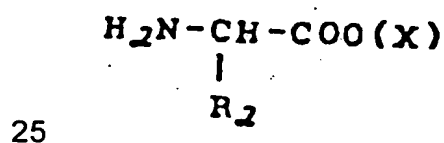


comprising reacting;

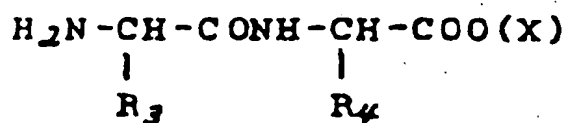
γ -L-glutamyl-L-amino acid, γ -D-glutamyl-L-amino acid or salt thereof being represented in formula (I),



α -L-amino acid or salt thereof being represented in formula (II),



dipeptide or salt thereof being represented in formula (III),



- 5 wherein the reaction is conducted in the presence of cultures, culture fluids, fungal forms or cell-free extracts of microbes; and R_1 , R_2 , R_3 , R_4 are amino-acid residues, R_1 and R_2 are different amino-acid residues, R_1 , R_3 and R_4 may be same amino-acid residues, X is hydrogen or an alkali-metal atom.



正本

(2000円) 特 許 願 (A)

昭和47年11月9日

特許庁長官 殿

1. 発明の名称

γ-グルタミルベブチドの製法

2. 発明者

住 所 東京都国分寺市旭町1-18-6
氏 名 (長 春 州 國 (姓か/名))

3. 特許出願人

郵便番号 100
住 所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号
名 称 (102)協和酸酵工業株式会社
代表者 高 田 弘

4. 添付書類の目録

- (1) 明 細 書 1通
(2) 願 書 副 本 1通

47-111631

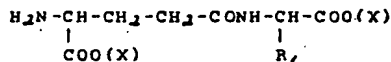
明 細 書

1. 発明の名称

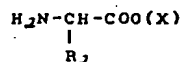
γ-グルタミルベブチドの製法

2. 特許請求の範囲

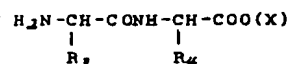
微生物の培養物、培養液、菌体、無細胞抽出液の存在下で、一般式Ⅰ



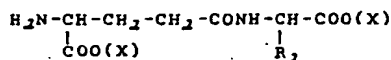
で表わされるγ-L(またはD)-グルタミル-L-アミノ酸もしくはその塩と、一般式Ⅱ



で表わされるα-L-アミノ酸もしくはその塩、または一般式Ⅲ



で表わされるジベブチドもしくはその塩とを反応せしめることを特徴とする一般式Ⅳ



① 日本国特許庁
公開特許公報

①特開昭 49-69888

③公開日 昭49.(1974) 7. 5

②特願昭 47-111631

②出願日 昭47.(1972) 11. 9

審査請求 未請求 (全5頁)

庁内整理番号

⑤2日本分類

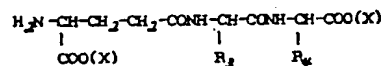
7025 49

36(2)D251

6664 43

16 B652

または一般式Ⅴ



で表わされるγ-グルタミルジ-またはトリベブチドもしくはそれらの塩の製法(式中、R₁、R₂、R₃、R₄はアミノ酸残基であり、R₁とR₂は異なるアミノ酸残基であり、R₃とR₄は同じアミノ酸残基であつてもよく、Xは水素またはアルカリ金属原子を示す。)

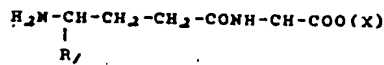
1. 発明の詳細な説明

本発明は微生物を利用することからなるγ-グルタミルベブチドもしくはその塩の製法に関する。

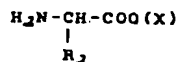
さらに詳しくは、本発明は、下配一般式Ⅰで表わされるジベブチドすなわちγ-L(またはD)-グルタミル-L-アミノ酸もしくはその塩と下配一般式Ⅱで表わされる適當なα-L-アミノ酸もしくはその塩または下配一般式Ⅲで表わされるL-アミノ酸のベブチドもしくはその塩とからベブチド転移反応によつて一般式Ⅳ

とは異なる別のジペプチド(下記一般式Ⅱ)またはトリペプチド(下記一般式Ⅲ)もしくはそれらの塩を製造する方法に關するものであつて、その特徴とするところは種々の微生物菌体またはそれらの無細胞抽出液などの存在下で該ペプチド転移反応を行うことにある。

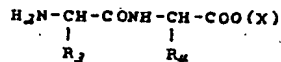
一般式Ⅰ



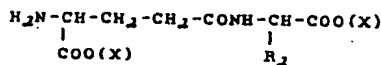
一般式Ⅱ



一般式Ⅲ



一般式Ⅳ



一般式Ⅴ



ミノ酸もしくはその塩からは α -L-グルタミンジ-およびトリペプチドもしくはそれらの塩が生成し、 α -D-グルタミン-L-アミノ酸もしくはその塩からは α -D-グルタミンジ-およびトリペプチドもしくはそれらの塩が生成する。

一般式ⅡとⅤのペプチドもしくはそれらの塩を生成するためには、一般式ⅠとⅢの化合物、または一般式ⅠとⅢの化合物をあとに述べる微生物の培養物、菌体、無細胞抽出液と共に、好ましくはpH 7.5〜9.5の適当な緩衝液中で30〜60℃、好ましくは37℃で、1〜5時間たとえは、攪拌しながら反応せしめる。反応に用いられる一般式Ⅰ、Ⅲの化合物の量は、一般式Ⅰの化合物に対し、3倍モル以上が好ましいが、これ以下の量でも勿論実施可能である。

この反応に用いられる微生物は一般式Ⅰで表わされる α -L(またはD)-グルタミン-L-アミノ酸と一般式Ⅱで表わされる α -L-アミノ酸または一般式Ⅲで表わされるジペプチド

(式中、 R_1 , R_2 , R_3 , R_4 はアミノ酸残基である。ただし、 R_1 , R_2 は異なるアミノ酸残基であり、 R_3 と R_4 , R_4 は同じアミノ酸残基であつてもよい。Xは水素またはアルカリ金属原子を示す。)

一般式ⅡおよびⅤで表わされる α -グルタミンペプチド類はグルタミン酸をはじめとして生体内の重要な生理活性物質であつて、本発明は、これらの物質の直接的な合成あるいは、これらの物質の中間体の合成に役立つものである。

本発明によれば一般式Ⅱのペプチドもしくはその塩は一般式ⅠとⅢの化合物から、また、一般式Ⅴのペプチドもしくはその塩は、一般式ⅠとⅢの化合物から菌体またはその無細胞抽出液と共に適当な緩衝液中で振とうすることによつて得られる。すなわち、本発明の方法によれば、任意の α -グルタミン-L-アミノ酸もしくはその塩から多種類の α -グルタミンジ-およびトリペプチドもしくはそれらの塩を合成し得る。この場合、 α -L-グルタミン-L-ア

とから一般式Ⅱまたは一般式Ⅴで表わされる α -グルタミンジ-またはトリペプチドを産生する微生物であれば、特に限定されるものではないが、好適なものとしては、ミコバクテリウム属、シュードモナス属、ザルチナ属、セラチア属、ミクロバクテリウム属、アクロモバクテリウム属、アルカリゲネス属、アースロバクテリウム属、バチルス属、プレビバクテリウム属、コリネバクテリウム属、エルビニア属、ミクロコッカス属などの微生物があげられその具体的な菌株例を次に示す。

ミコバクテリウム・プレビカレ ATCC/5113
ミコバクテリウム・スメグマテス ATCC21293
シュードモナス・アエルギノース ATCC/5246
シュードモナス・グルジビエ ATCC21283
ザルチナ・ルテア ATCC/5176
セラチア・マルセフセンス ATCC/9180
ミクロバクテリウム・フラブム ATCC/0340
アルカリゲネス・フエカリス ATCC5094
アルカリゲネス・ビスコラタス ATCC 9036
アースロバクテリウム・シンプレックス ATCC/5799

アースロバクター・ペラフィネウス ATCC/3391

アースロバクター・シトレウス ATCC/1624

バチルス・メガテリウム ATCC/9380

バチルス・ズブテリス ATCC6051

プレバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC6872

プレバクテリウム・リネンス ATCC9775

コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC/3032

コリネバクテリウム・イクイ IAM/038

エルビニア・カロトボラ IPO3057

ミクロコッカス・ソドネンシス ATCC/19212

ミクロコッカス・ルテウス ATCC398

ミクロコッカス・パリアンシス ATCC399

これらの微生物の培養には、通常の培地が使用される。即ち、炭素源としては、グルコース、フラクトース、シュークロース、澱粉加水分解液、糖蜜など、窒素源としては、硫酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、尿素などの無機および有機のアンモニウム塩ならびに酵母エキス、肉エキス、ペプトン、N2アミン、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、フィッシュミール

など、無機塩としては、リン酸一水素カリ、リン酸二水素カリ、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガ、硫酸カルシウムなどを適宜使用する。

培養は振とう培養あるいは通気攪拌培養などの好気条件下で行う。培養温度は通常20〜40℃で、培地中のpHは中性附近で、1〜3日間培養する。

反応終了後、菌体あるいはタンパク質を除去し、通常の方法によつて一般式IIまたはVのペプチドを単離する。即ち、たとえば、菌体除去後の反応液をイオン交換クロマトグラフィーにかけ分離する。この方法の吸着剤としては好ましくは塩基性イオン交換樹脂たとえばダウエクセス-1（ダウケミカル社製）やダイヤイオン8A-10A（三菱化成社製）などが用いられる。

以下に実施例を示すが、このにおいて生成したペプチドの同定はすべて電気泳動法およびペーパークロマトグラフを用いて行つた。

即ち、電気泳動は高圧紙電気泳動装置（富士理研製）で、酢酸-ピリジン-アセトン-水（40:20:150:790）（容量比）の泳動液を用い、25KV、60分の泳動条件下で、試料の他に別に各種ペプチドの標準品を用意して行つた。

該条件下における各種ペプチドおよびアミノ酸（標準品）の移動度を示せば次の通りである。試料の各ペプチドも相当する標準品の移動度に一致した。

| ペプチドおよびアミノ酸 | 移動度 |
|-------------|---------|
| r-Glu-Glu | 1.2 (m) |
| r-Glu-Ser | 1.0 |
| r-Glu-Leu | 1.1 |
| r-Glu-Ala | 1.08 |
| r-Glu-Phe | 1.3 |
| r-Glu-Ileu | 1.4 |
| r-Glu-Val | 1.5 |
| r-Glu-Thr | 1.0 |
| r-Glu-Cys | 1.5 |

| | |
|-------------------|-----|
| r-Glu-Lys | 1.0 |
| r-Glu-Arg | 1.0 |
| r-Glu-His | 1.0 |
| r-Glu-Gly | 1.1 |
| r-Glu-Tyr | 1.0 |
| r-Glu-Pro | 1.1 |
| r-Glu-Hydroxy-Pro | 1.2 |
| r-Glu-Met | 1.5 |
| r-Glu-Glutamine | 1.5 |
| r-Glu-Orn | 1.0 |
| r-Glu-α-アミノ酸 | 1.3 |
| r-Glu-Phe-Gly | 1.4 |
| r-Glu-Glu-Glu | 1.6 |
| r-Glu-Phe-Leu | 1.4 |
| 中性アミノ酸 | 0 |
| グルタミン酸 | 1 |

電気的に中性で移動しない。

またペプチドを構成するアミノ酸は、試料（生成したペプチド）を3N-HClに溶解し、120℃で4時間加水分解し、ペーパークロマト

トグラフによつて確認した。

即ち、この条件下で、 α -ペプチドは殆んど分解せず、 γ -グルタミン^ペペプチドは完全に分解し、グルタミン酸と他の構成アミノ酸に分解していることが確認された。

なお、ペーパークロマトグラフは東洋口紙 55/1 を用い、これに標準品と試料をスポットし、エチルアルコール-水-アンモニア (15:1:1) の溶媒を用い、ニンヒドリン発色により行つた。次に標準品のペプチドの Rf 値を示すが、試料は相当する標準品の Rf 値に一致した。

次にその一例を示す。

| ペプチド | 構成アミノ酸および Rf 値 |
|--------------------|---------------------|
| γ -Glu-Glu | Glu(0.06) |
| γ -Glu-Ser | Glu(0.06) Ser(0.25) |
| γ -Glu-Leu | Glu() Leu(0.60) |
| γ -Glu-Ala | Glu() Ala(0.35) |
| γ -Glu-Phe | Glu() Phe(0.46) |
| γ -Glu-Ileu | Glu() Ileu(0.56) |

実施例 1

3% 粉末ブイヨン、0.5% 酵母エキスおよび 3% ブドウ糖を主成分とする液体培地で 30℃ 48 時間培養して得たアルカリゲネス・フェカリス A TCC 25074 の菌体を生理的食塩水で十分洗浄後、0.25 モルのトリス緩衝液 (pH 10) に 0.6 g/ml になるよう懸濁する。この菌体含有液 100 ml に 0.1 モルの γ -L-グルタミン-L-グルタミン酸水溶液 (緩衝液で pH 10 としたもの) と、0.4 モルの L-バリン水溶液それぞれ 100 ml を加え 37.5℃ で 1 時間振盪する。反応終了後反応液から遠心分離によつて菌体を除き、残液をダウエックス-1 (OH⁻ タイプ) 500 ml に吸着させる。水洗後 0.25 規定の酢酸で γ -L-グルタミン-L-バリンを溶出する。この溶出液にアセトンを加え、白色粉末の γ -L-グルタミン-L-バリン 2.6 g を得た。

実施例 2

実施例 1 と同様の方法によつて培養して得た

| | |
|---|-------------------------------|
| γ -Glu-Val | Glu(0.06) Val(0.57) |
| γ -Glu-Thr | Glu() Thr(0.39) |
| γ -Glu-Cys | Glu(0.25) Cys(0.11) |
| γ -Glu-Lys | Glu(0.06) Lys(0.18) |
| γ -Glu-Arg | Glu() Arg(0.10) |
| γ -Glu-His | Glu() His(0.25) |
| γ -Glu-Gly | Glu() Gly(0.21) |
| γ -Glu-Tyr | Glu() Tyr(0.35) |
| γ -Glu-Pro | Glu() Pro(0.40) |
| γ -Glu-Hydroxy-Pro | Glu() Hydroxy-Pro(0.27) |
| γ -Glu-Met | Glu() Met(0.45) |
| γ -Glu-Glutamine | Glu() グルタミン(0.13) |
| γ -Glu-Orn | Glu() Orn(0.) |
| γ -Glu- α -アミノ [※] 酸 | Glu() α -ABA(0.41) |
| γ -Glu-Phe-Gly | Glu() Phe(0.45) Gly(0.20) |
| γ -Glu-Glu-Glu | Glu() |
| γ -Glu-Phe-Leu | Glu(0.05) Phe(0.44) Leu(0.58) |

※ブタノール:酢酸:水(1:2:3)の溶媒を使用

※4N-HCl に溶解し、120℃で1時間加水分解した。

エルビニア・カロトボラ IPO 3057 の菌体を超音波処理して細胞を破壊後、遠心してその無細胞抽出液をとる。この抽出液 50 ml に 0.2 モルの γ -D-グルタミン-L-リジン水溶液 50 ml と 1 モルの L-スレオニン水溶液 50 ml (いずれも緩衝液で pH 10 としたもの) を加え、37.5℃ で 1 時間反応させる。反応終了後、塩酸性にして除タンパクし、中和してダウエックス 1 × 2 (OH⁻ タイプ) 500 ml のカラムに通筒する。水洗後 0.25 モルの酢酸で溶出する部分にアセトンを加え、白色粉末の γ -D-グルタミン-L-スレオニン 2.1 g を得る。

実施例 3

実施例 2 と同様の方法で得たエルビニア・カロトボラ IPO 3057 の無細胞抽出液 50 ml に、0.2 モルの γ -L-グルタミングルタミン酸水溶液 50 ml と、 α -ジペプチドである L-フェニルアラニルグリシンの 0.5 モル水溶液 50 ml を加えて 37.5℃ で 1 時間反応せしめる。塩酸性下で除タンパクを行ない、残液を中和して

ダウエックスノック (OH-タイプ) 500ml のカラムに通筒する。水洗後、0.25規定の酢酸で溶出する部分にアセトンを加え、白色粉末のトリペプチド、すなわち γ -L-グルタミン-L-フェニルアラニルグリシン 0.77g を得る。

実施例 4

実施例 1 と同様の方法によつて培養して得たコリネバクテリウム・グルタミカム ATCC 13035 の菌体を生理的食塩水で十分洗浄後、0.25モルのトリス緩衝液 (pH 10) に 0.4g/ml になるように懸濁する。この菌体含有液 100ml に 0.1モルの下記 γ -グルタミン-L-アミノ酸溶液 (前記と同様の緩衝液で pH 10 としたもの) と 0.4モルの各種アミノ酸溶液またはジペプチドをそれぞれ 100ml を加え、37.5℃ で 1時間培養した結果、反応液中に次のペプチドの存在が確認された。

| 基 | 質 | 生成ペプチド |
|------------------------|----------------|-------------------------------|
| γ -グルタミン-L-アミノ酸 | L-アミノ酸およびジペプチド | |
| γ -Glu-Ser | グルタミン酸 | γ -Glu-Glu |
| γ -Glu-Ala | セリン | γ -Glu-Ser |
| γ -Glu-Ser | ロイシン | γ -Glu-Leu |
| γ -Glu-Leu | アラニン | γ -Glu-Ala |
| γ -Glu-Ala | フェニルアラニン | γ -Glu-Phe |
| γ -Glu-Phe | イソロイシン | γ -Glu-Ileu |
| γ -Glu-Glu | バリン | γ -Glu-Val |
| γ -Glu-Lys | スレオニン | γ -Glu-Thr |
| γ -Glu-Thr | リジン | γ -Glu-Lys |
| γ -Glu-Glu | システイン | γ -Glu-Cys |
| γ -Glu-Lys | アルギニン | γ -Glu-Arg |
| γ -Glu-Arg | ヒスチジン | γ -Glu-His |
| γ -Glu-His | グリシン | γ -Glu-Gly |
| γ -Glu-Gly | チロシン | γ -Glu-Tyr |
| γ -Glu-Tyr | プロリン | γ -Glu-Pro |
| γ -Glu-Pro | ヒドロキシプロリン | γ -Glu-Hydroxy-Pro |
| γ -Glu-Ala | メチオニン | γ -Glu-Met |
| γ -Glu-Met | グルタミン | γ -Glu-Glutamine |
| γ -Glu-Ala | オルニチン | γ -Glu-Orn |
| γ -Glu-Orn | α -アミノ酸 | γ -Glu- α -アミノ酸 |
| γ -Glu-Glu | L-フェニルアラニルグリシン | γ -Glu-Phe-Gly |
| γ -Glu-Glu | L-グルタミン-グルタミン酸 | γ -Glu-Glu-Glu |
| γ -Glu-Glu | L-フェニルアラニルロイシン | γ -Glu-Phe-Leu |

上記以外の発明者

マダシシタヤ
 住所 東京都国市南大谷 1-3-2
 氏名 橋原 功